

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



(19) RU<sup>(11)</sup> 2 217 196<sup>(13)</sup> C2  
(51) МПК<sup>7</sup> А 61 Р 35/00, А 61 К 31/325,  
31/205

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2002105392/14, 28.02.2002  
(24) Дата начала действия патента: 28.02.2002  
(46) Дата публикации: 27.11.2003  
(56) Ссылки: RU 96110217 А, 10.08.1998. ЕР  
1020179, 19.07.2000. RU 2148056 С1,  
27.04.2000. RU 2140918 С1, 10.11.1999.  
(98) Адрес для переписки:  
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,  
ООО "Юридическая фирма Городиский и  
партнеры", Г.Б.Егоровой

(72) Изобретатель: Небольсин В.Е.,  
Горбунова В.А., Трещалин И.Д., Райхлин  
Н.Т., Гарин А.М., Бычков М.Б., Трещалина  
Е.М., Желтухина Г.А.

(73) Патентообладатель:  
Небольсин Владимир Евгеньевич

(54) СПОСОБ ИНДУКЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК

(57)  
Изобретение относится к медицине, в  
частности к лечению онкологических  
заболеваний, и может быть использовано при  
лечении опухолей различного генеза. Способ  
включает введение  
4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил]масля  
ной кислоты в эффективном количестве.  
Предпочтительно введение препарата  
ежедневно перорально в дозе 0,5-5,0 мг/кг в

сочетании с химиотерапией не менее 15 дней.  
Для повышения эффективности  
иммунотерапии опухолей препарат вводят  
совместно с интерфероном. Способ позволяет  
проводить эффективную нецитотоксическую  
терапию онкологических заболеваний, в  
частности меланомы, и коррекцию  
гематологической токсичности  
химиопрепаратов, стабилизировать рост  
опухоли. 2 с. и 6 з.п. ф-лы, 22 табл.

RU 2 217 196 C2

RU 2 217 196 C2



(19) **RU**<sup>(11)</sup> **2 217 196**<sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 P 35/00, A 61 K 31/325,**  
**31/205**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2002105392/14, 28.02.2002

(24) Effective date for property rights: 28.02.2002

(46) Date of publication: 27.11.2003

(98) Mail address:  
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,  
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
partnery", G.B.Egorovoj

(72) Inventor: Neboľ'sin V.E.,  
Gorbunova V.A., Treshchalın I.D., Rajkhlin  
N.T., Garin A.M., Bychkov M.B., Treshchalina  
E.M., Zheltukhina G.A.

(73) Proprietor:  
Neboľ'sin Vladimir Evgen'evich

(54) **METHOD FOR INDUCTION OF CELLS DIFFERENTIATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, oncology. SUBSTANCE:  
invention relates to treatment of  
oncological diseases and can be used in  
treatment of tumors of different genesis.  
Method involves administration of  
4-N-[2-(imidazol-4-yl)ethyl]carbonyl-butyric  
acid in effective dose. Preferably the every  
day oral administration of preparation in  
the dose 0.5-5.0 mg/kg in combination with  
chemotherapy for 15 days, not less. For

enhancement of effectiveness of  
immunotherapy of tumors preparation is  
administrated in combination with  
interferon. Method allows carrying out the  
effective non-cytotoxic therapy of  
oncological diseases, in part melanoma, and  
correction of hematological toxicity of  
chemopreparations and to stabilize growth of  
tumor. EFFECT: improved induction method,  
valuable medicinal properties of  
preparation. 8 cl, 22 tbl, 8 ex

Таблицы

Формула изобретения:

1. Способ индукции дифференцировки клеток у млекопитающих, в том числе человека, включающий введение 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляной кислоты в эффективном количестве.

2. Способ по п.1, в котором 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляную кислоту вводят ежедневно перорально в дозе 0,5-5,0 мг/кг.

3. Способ по любому из пп.1 и 2, в котором 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляную кислоту вводят в сочетании с курсом химиотерапии.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором для стабилизации роста злокачественных опухолей 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил]

масляную кислоту вводят не менее 15 дней.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором для повышения эффективности иммунотерапии злокачественных опухолей 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляную кислоту вводят совместно с интерфероном.

6. Способ по любому из пп.4 и 5, в котором злокачественная опухоль является меланомой.

7. Способ по любому из пп.1-3, в котором для снижения гематологической токсичности 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляную кислоту вводят за 5 дней до начала курса химиотерапии и вплоть до его окончания.

8. Применение 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляной кислоты для индукции дифференцировки клеток у млекопитающих.

25

30

35

40

45

50

55

60

#### Описание

Изобретение относится к медицине и, в частности, к лечению онкологических заболеваний и может быть использовано при лечении опухолей различного генеза.

Изобретение относится к способу индукции дифференцировки клеток с применением 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляной кислоты (Дикарбамина®) в качестве агента индуцирующего дифференцировку клеток, и, в частности, к его использованию в противоопухолевой нецитотоксической терапии.

Известно, что отсутствие способности к дифференцировке у большей части опухолевых клеток приводит к безудержному росту опухоли.

Поэтому одним из новых подходов к противоопухолевой нецитотоксической терапии является поиск средств как специфической, так и неспецифической индукции дифференцировки клеток.

Под индукцией дифференцировки клеток понимают способность различных веществ восстанавливать (или запускать) утраченные или сниженные в результате различных причин функции: прохождение клеткой нормального клеточного цикла, синтез биологически активных жизненно важных веществ

в ней и т.п.

Вещества или соединения, механизм действия которых не связан с одной конкретной функцией клетки и которые могут вызывать ее дифференцировку по нескольким параметрам, можно отнести к неспецифическим индукторам дифференцировки.

Известны способы индукции дифференцировки опухолевых клеток путем введения ретиноидов или  $\alpha$ -2-интерферона [Cancer Res., 40, 3345-3350, 1980].

В качестве средства продления ремиссии после индукционной или постремиссионной терапии острого промиелоцитарного лейкоза используется индуктор дифференцировки клеток политрансретиноевая кислота (ПТРК). Дифференцировка клеток под воздействием производных ретиноевой кислоты ведет к стабилизации роста опухолевых клеток [Справочник практической химиотерапии опухолей//ред. А. М. Гарин, А. В. Хлебнов, М., 1995 г.; Савченко В.Г., Паровичникова Е.Н.//Новые подходы в терапии острых лейкозов.-В кн.: Клиническая онкогематология (под редакцией М.А.Волковой).-Москва.-Медицина.-2001г.-гл.15.-стр.208-213; Абелев Г.И.//Дифференцировка и опухолевый фенотип в клетках лейкозов и лимфом.-В кн.: Клиническая онкогематология (под ред. М.А.Волковой).-Москва.-Медицина.-2001.-гл.11.-стр.116-123].

Использование препаратов  $\alpha$ -интерферона при лечении меланомы в качестве средства иммунотерапии также связано с

индукцией дифференцировки опухолевых клеток, в которых повышается способность к адгезии и меняется антигенный профиль. Проведение интерферонотерапии вызывает снижение прогрессии опухолевого роста, а также предупреждает развитие и скорость метастазирования [Справочник практической химиотерапии опухолей//ред. А. М. Гарин, А. В. Хлебнов, М., 1995 г.; Кадагидзе З.Г. // Цитокины и их использование в онкологии.- Int. J. of Immunorehabilitation.- 1997-№6.- p.47-56; Atzpodien J., Kirchner H. // Cancer, cytokines, and cytotoxic cells: interleukin-2 in the immunotherapy of human neoplasms. - Klin. Wochenschr.- 1990.- v.68.- p.1-7].

В последние годы вошли в клиническую практику препараты, вызывающие дифференцировку кроветворных клеток, поврежденных в результате цитотоксической химиотерапии. Эти препараты представляют собой различные цитокины, полученные из костного мозга, такие как гематогормоны: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и др. Их применение при лечении различных опухолей человека приводит к ускорению созревания клеток костного мозга и предупреждает гематологический цитотоксический эффект химиопрепаратов [Белоусова А.Е. // Молекулярно-биологические подходы к терапии опухолей.-М.-НПЦ «МедБиоСпектр».-ВИНИТИ.-1993 г.-стр.180; Варфоломеева С.Р., Добренчиков А.В., Тимаков А.М. и соавт. // Опыт применения колониестимулирующих факторов (Г-КСФ и ГМ-КСФ) у детей с

гематоонкологическими заболеваниями.-Российский онкологический журнал.-1998 г.-№ 2.-стр.50-53; Crawford J., Ozer H., Stoller R. et al. // Phase II of clinical investigation of GM-CSF by the patients of SCLC with the dose-intensive chemotherapy.-The New England Journal of Medicine.-1991.-v.325.-№3.- p.164-170].

Таким образом, индукция дифференцировки опухолевых клеток является одним из ведущих механизмов стабилизации роста новообразований, повышения эффекта иммунотерапии и коррекции гематологической токсичности химиопрепаратов.

Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что 4-[N-(2-(имидазол-4-ил)этил)карбамоил] масляная кислота (Дикарбамин®) описанный в международной заявке PCT/RU98/00215, обладающий антиоксидантным, антиастматическим, антигипоксическим, противовоспалительным, противовирусным, антибактериальным, липидрегулирующим, антиметастатическим, а также другими видами терапевтического действия, является мощным индуктором дифференцировки клеток и может быть использован в качестве агента для нецитотоксической терапии онкологических заболеваний, в частности, меланомы, а также в качестве гематокорректирующего агента.

Настоящее изобретение относится к способу индукции дифференцировки клеток, включающему введение в качестве активного агента эффективного количества 4-[N-(2-(имидазол-



4-ил)этил)карбамоил] масляной кислоты (Дикарбамина®).

В предпочтительном варианте изобретения активное соединение вводят в дозе 0,5-5,0 мг/кг веса тела.

В другом предпочтительном варианте изобретения Дикарбамин вводят в сочетании с химиотерапией.

Предпочтительным вариантом изобретения также является способ индукции дифференцировки клеток в котором для стабилизации роста злокачественных опухолей, в частности меланомы Дикарбамин вводят в дозе 0,5-5,0 мг/кг веса тела в течение не менее 15 дней при исчерпанных возможностях химиотерапии.

Введение Дикарбамина совместно со средством иммунотерапии интерфероном приводит к повышению его эффективности в отношении клеток злокачественных опухолей, в частности меланомы.

Еще одним предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является способ индукции дифференцировки клеток, в котором для повышения эффективности иммунотерапии меланомы, Дикарбамин вводят в дозе 0,5-5,0 мг/кг веса тела в течение не менее 15 дней совместно с введением интерферона.

Предпочтительным вариантом настоящего изобретения также является способ индукции дифференцировки клеток, в котором для снижения гематологической токсичности Дикарбамин вводят в дозе 0,5-5,0 мг/кг веса тела за 5 дней до начала курса

химиотерапии, во время проведения химиотерапии и в период между курсами вплоть до следующего курса цитотоксической терапии.

Далее представлены примеры, иллюстрирующие предпочтительные варианты воплощения изобретения.

Пример 1. Активность Дикарбамина в отношении дифференцировки клеток меланомы М-6.

Исследование проводили на бестимусных (nude) мышам-самках линии Balb/C 10-12 недельного возраста, весом 20-22 грамма (разведение РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). Для трансплантации бестимусным мышам был взят штамм меланомы человека М-6, ранее полученный из первичного клинического материала. Опухоль дезинтегрировали раствором Версена с прижизненной окраской трипановым синим и перевивали мышам под кожу по 1,6 млн клеток на мышь.

Дикарбамин вводили мышам ежедневно в дозе 1,0 мг/кг в желудок с помощью металлического зонда, начиная за 4 дня до перевивки опухоли, и затем в течение 10-11 дней (курс введения - до 15 дней). Через 12, 24 и 48 часов после последнего введения препарата мышей забивали эфирным наркозом.

В опыте использовали 4 группы мышей:

- 1 группа - контрольная, без воздействия Дикарбамина. Мышей забивали в сроки, параллельно группам, получавшим Дикарбамин.

- 2 группа - вводили Дикарбамин и забивали мышей через 12 часов после окончания его введения.
- 3 группа - вводили Дикарбамин и забивали мышей через 24 часа после окончания его введения.
- 4 группа - вводили Дикарбамин и забивали мышей через 48 часов после окончания его введения.

Для контроля за степенью дифференцировки и пролиферации меланомы М-6 в группах контрольных животных и в группах с Дикарбаминном определяли 4 морфологических показателя, такие, как число клеток с пигментом и число клеток с признаками апоптоза (способность к дифференцировке), число митозов (пролиферативная активность) и площадь некроза. Эти показатели определяли в динамике и соотносили к общей морфологической картине опухолевого роста, как интегральному признаку. С этой целью у мышей забирали опухоль, помещали в формалин и проводили гистологическую обработку для световой микроскопии. Полученные данные представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Морфологические показатели меланомы М-6 (световая микроскопия)

Показатели (в %)		Время, прошедшее с момента отмены Дикарбамина		
		12 часов	24 часа	48 часов
Площадь	Контроль	1-2	2-3	3-5

некроза	После введения Дикарбамина	6-7	7-9	8-10
Митозы	Контроль	3-5	3-5	3-5
	После введения Дикарбамина	3-5	3-5	3-5
Апоптоз	Контроль	0,1-0,2	0,1-0,2	0,1-0,2
	После введения Дикарбамина	0,1-0,2	0,2-0,3	0,2-0,3
Клетки с пигментом	Контроль	1-2	1-2	2-3
	После введения Дикарбамина	2-3	2-4	3-5

Проведенное исследование позволило установить, что перевиваемая бестимусным мышам меланома человека М-6 на 9 сутки образует опухоль, состоящую из полиморфных клеток, которые растут сплошными полями с незначительным развитием стромы. В опухоли встречаются небольшие участки некроза, которые несколько увеличиваются к 48 часам (до 3-5 % площади среза) по сравнению со сроками забоя 12, 24 часа (соответственно, 1-2 и 2-3 %). Во все периоды роста в опухоли наблюдается много митозов (3-5 %). Апоптоз выражен слабо. Клетки, содержащие пигмент, встречаются редко, их число в течение первых суток не превышает 1-2 % и только через 48 часов роста увеличивается до 2-3 %. Таким образом,

интенсивность меланиногенеза в этот период незначительная. Полученная характеристика позволяет сделать вывод о том, что меланома М-6 является быстро растущей опухолью, практически утратившей способность к дифференцировке как по степени апоптоза, так и, прежде всего, по основной функциональной способности - меланиногенезу.

Оценку влияния Дикарбамина на дифференцировку клеток М-6 по основному показателю - интенсивности меланиногенеза проводили путем подсчета числа клеток с меланином в срезах опухоли. С этой целью у мышей забирали опухоль, помещали в глутаральдегид и проводили гистологическую обработку для электронной микроскопии. В полученных срезах рассчитывали Индекс интенсивности меланиногенеза (ИИМ) который отражает степень дифференцировки клеток.

$$\text{ИИМ} = \text{ПК} \times \text{ПМ},$$

где: ПК- количество клеток содержащих меланосомы;

ПМ - среднее количество меланосом на клетку.

Анализ интенсивности меланиногенеза, проведенный по этому показателю, представлен в Таблице 2.

Таблица 2. Сравнительная интенсивность меланиногенеза в клетках меланомы М-6 после введения Дикарбамина (электронная микроскопия)

Показатели (абсолютные величины)		Время, прошедшее с момента отмены Дикарбамина		
		12 часов	24 часа	48 часов
Число клеток с меланосомами (на 500 клеток)	Контроль	135,0	144,0	159,0
	После введения Дикарбамина	175,0	210,0	227,0
Среднее число меланосом на клетку	Контроль	19,0	21,0	26,0
	После введения Дикарбамина	28,0	35,0	42,0
ИИМ	Контроль	5,1	6,0	8,2
	После введения Дикарбамина	9,8	14,7	19,0

\* начиная с 9 суток после перевивки опухоли

В результате электронно-микроскопического исследования показано, что по сравнению с контролем под влиянием Дикарбамина увеличивается число опухолевых клеток,

содержащих меланосомы, и число меланосом на одну клетку. Индекс ИИМ увеличивается по срокам наблюдения: через 12 часов - в 1,9 раза, через 24 часа - в 2,4 раза и через 48 часов - в 2,3 раза.

Таким образом, после 15-дневного курса введения Дикарбамина увеличивается степень дифференцировки опухолевых клеток меланомы М-6, в среднем, в 2,2 раза, что подтверждается интенсивностью меланиногенеза (индекс ИИМ), увеличением числа клеток, содержащих меланосомы (в 1,3 раза), и увеличением в них числа меланосом (в 1,3 раза).

Пример 2. Действие Дикарбамина на меланинсинтезирующую функцию клеток перевиваемой меланомы человека М-6.

Мышам с перевитой подкожно меланомой человека М-6, как описано в примере 1, вводили Дикарбамин ежедневно перорально в более высокой разовой дозе 4,5 мг/кг в течение 3 недель от момента трансплантации опухоли.

Забой животных производили через 3 недели от момента трансплантации опухоли. Объем опухолей к моменту забоя составлял в среднем 150 мм<sup>3</sup>. После забоя у мышей забирали опухоль, которую дезинтегрировали раствором Версена и выделяли клеточную фракцию, в которой при световой микроскопии в камере Горяева подсчитывали число клеток с пигментом.

В результате проведенных исследований показано, что в

контроле среднее число клеток с меланином составило  $39,14 \pm 8,72$ , а в опыте  $108,42 \pm 11,91$ , т.е. число меланинсинтезирующих клеток достоверно увеличилось в 3 раза ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, в результате проведения серии экспериментов с применением Дикарбамина в разных дозах был получен статистически достоверный эффект выраженной индукции дифференцировки в клетках меланомы человека М-6 по интенсивности меланиногенеза.

Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3. Интенсивность меланиногенеза в клетках меланомы человека М-6, вызванная действием Дикарбамина

Номер опухоли	Контроль	Номер опухоли	Опыт
	Число клеток с меланином		Число клеток с меланином
1	32	1	95
2	35	2	111
3	29	3	95
4	42	4	110
5	46	5	130
6	36	6	106
7	54	7	111
Среднее	39,14	Среднее	108,42*
Ст.откл	8,72	Ст.откл	11,91



\*p<0,01

Пример 3. Влияние Дикарбамина на динамику роста перевиваемой меланомы человека М-6

Исследование проводили на бестимусных (nude) мышам-самках линии Balb/C 10-12 недельного возраста весом 20-22 грамма, (разведение РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН). Для трансплантации бестимусным мышам брали штамм меланомы человека М-6, ранее полученный из первичного клинического материала.

Дикарбамин в разовых дозах 1,5 мг/кг и 4,5 мг/кг вводили ежедневно перорально в двух группах мышей в течение 3 недель от момента возникновения опухоли (с 15 по 36 день от момента трансплантации штамма).

Измерение размеров опухоли было проведено на 18, 25, 33, 39, 46 и 53 дни от момента трансплантации. Оценку действия Дикарбамина проводили по динамике роста опухоли в течение 8 недель при многократном измерении объемов опухолей «V» по формуле:

$$V = \pi \cdot L \cdot s \cdot h \text{ (мм}^3\text{)}$$

где L - длина в мм, s - ширина в мм, h - высота в мм.

Затем вычисляли соотношение объемов опухолей  $V_t/V_{t-1}$ , которое выражали в процентах и обрабатывали статистически по методу Стьюдента для расчета достоверности. Полученные данные

представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Влияние препарата Дикарбамин на рост меланомы человека М-6 у бестимусных мышей

День после перевивк и	Контроль n=7		Дикарбамин 1,5 мг/кг n=10			Дикарбамин 4,5 мг/кг n=10		
	M+m*		M+m			M+m		
	V	%	V	%	p**	V	%	p
18 день	66,2±22,8	100	21,8±12,8	100		91,9±54,4	100	
25 день	266,0± 69,4	329,0± 88,9	77,5±46,4	302,0± 186,0	0,82	266,0± 198,0	166,0± 93,0	0,015
33 день	582,0± 127,4	132,9± 57,3	342,0± 142,0	428,0± 313,1	0,11	852,0± 495,0	276,0± 104,0	0,011
39 день	701,0± 123,5	21,9±12,6	435,0± 187,0	23,2±22,1	0,92	1129,0± 600,0	39,8± 27,3	0,169
46 день	778,0± 148,4	10,5±8,1	662,0± 417,0	23,9±31,0	0,45	1354,0± 735,0	19,6± 17,5	0,276
53 день	821,0± 221,8	3,8±10,3	783,0± 423,0	18,6±54,0	0,43	1550,0± 780,0	4,2±22,5	0,538

\*-среднее значение со средним отклонением, \*\*-расчет достоверности производился только для данных процентного изменения объема опухоли.

Полученные данные показали задержку максимального прироста опухолевой массы на 7 дней относительно контроля. В сравнении с контрольной группой на 25 день от момента

трансплантации выявлены статистически значимые различия по скорости роста опухоли в группе мышей, получавших Дикарбамин в разовых дозах 4,5 мг/кг, что соответствует 10-дневному курсу введения Дикарбамина и курсовой дозе 45 мг/кг. В этой группе средний объем опухоли увеличился на  $166,0 \pm 93,0\%$ , тогда как в контроле этот показатель составил  $329,0 \pm 88,9\%$  ( $p < 0,015$ ).

Пример 4. Влияние Дикарбамина в комбинации с химиотерапией на рост перевиваемой меланомы человека М-6, трансплантированной бестимусным мышам.

Исследование проводили по методике, описанной в примере 3. Дикарбамин вводили ежедневно перорально в разовой дозе 4,5 мг/кг в течение 3 недель от момента возникновения опухоли (с 15 по 36 день от момента трансплантации). В группах комбинированного лечения препарат Дикарбамин также вводили ежедневно в разовой дозе 4,5 мг/кг в течение 3 недель (15-36 день) в сочетании с однократным введением противоопухолевых цитостатиков - цисплатина в дозе 6 мг/кг в/в (25 день) и аранозы в дозе 40 мг/кг в/б (27 день). Терапию цитостатиками начинали при среднем объеме опухолей  $200 \pm 62$  мм<sup>3</sup>. На 18, 25, 33, 39, 46 и 53 дни от момента трансплантации проведено измерение объемов опухолей и рассчитана величина  $V_t/V_{t-1}$ , которую выражали в процентах. Полученные данные представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Динамика роста меланомы человека М-6 под действием комбинированной химиотерапии Дикарбамином и противоопухолевыми цитостатиками

Группа мышей	Схема терапии		M $\pm$ m (%) на сутки после перевивки опухоли				
	Доза(мг/кг) разовая/ курсовая	Сутки введе- ния	25 день	33 день	39 день	46 день	53 день
Контроль	физ. р-р per os	15-36	329,0 $\pm$ 88,9	132,9 $\pm$ 57,3	21,9 $\pm$ 12,6	10,5 $\pm$ 8,1	3,8 $\pm$ 10,3
Цисплатин Араноза	6 мг/кг в/в	25	413,0 $\pm$	177,0 $\pm$	62,0 $\pm$ 30,1	21,2 $\pm$	18,2 $\pm$
	40 мг/кг в/в	27	276,0	46,0		18,7	12,7
дикарбамин	4,5/94,5 мг/кг per os*	15-36	166,0 $\pm$ 93,0**	276,0 $\pm$ 104,0	39,8 $\pm$ 27,3	19,6 $\pm$ 17,5	4,2 $\pm$ 22,5
дикарбамин цисплатин араноза	4,5/94,5 мг/кг per os*	15-36	182,0 $\pm$ 60,0**	191,0 $\pm$ 71,0	24,5 $\pm$ 17,4	28,7 $\pm$ 9,8	8,0 $\pm$ 30,6
	6 мг/кг в/в	25					
	40 мг/кг в/в	27					

\*-ежедневно; \*\*-p<0,05

Из представленных данных следует, что Дикарбамин в использованном режиме введения задерживает рост опухоли на начальных этапах, что видно по уменьшению прироста

опухолевой массы на 25 сутки  $166,0 \pm 93,0\%$  в сравнении с контролем, где прирост составил  $329,0 \pm 88,9\%$ . Таким образом, были воспроизведены результаты по действию препарата Дикарбамин на рост меланомы (см. пример 3). Комбинированная химиотерапия препаратами араноза и цисплатин в указанных режимах оказалась неэффективна: прирост опухоли на этот срок был больше контрольной величины -  $413,0 \pm 276,0\%$ . Это свидетельствует об отсутствии чувствительности использованного штамма меланомы человека М-6 к данной схеме химиотерапии. Введение в схему неэффективной химиотерапии препарата Дикарбамин приводило к значительному статистически достоверному ( $p < 0,05$ ) уменьшению прироста опухолевой массы на 25 сутки на  $182,0 \pm 60,0\%$ , что доказывает его эффективность при использовании в случае отсутствия эффекта химиотерапии.

Пример 5. Действие Дикарбамина на пролиферативную способность клеток на фоне введения интерферона.

Изучали действие Дикарбамина на пролиферативную способность клеток меланомы на фоне введения  $\alpha$ -интерферона (Интрона<sup>®</sup>, ИН). Надо отметить, что и сам Дикарбамин обладает способностью замедлять пролиферативную активность меланомных клеток, не изменяя их выживаемости.

Исследование проводили на двух постоянных клеточных культурах, растущих в виде монослоя в культуре ткани - на клетках мышинной меланомы В-16 и клетках меланомы человека М-

5. ИН вводили в концентрациях 70-700 МЕ/мл. Препарат Дикарбамин (Д) переводили в маточный раствор (1000 мкМ), стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0,22 микрона, далее разводили до концентраций 0,01 и 1,0 мкМ.

Действие препаратов на клетки оценивали по начальной скорости размножения клеток (НСРК). Этот показатель (НСРК), который обычно называют скоростью роста колоний, определяли путем подсчета количества клеток в микроколониях в первые дни после воздействия в «опытных» (с препаратами) и «контрольных» (без препаратов) чашках, анализируя в каждой из них по 50 колоний. На каждую «точку» приходилось не менее трех чашек Петри с растущими колониями клеток при добавлении определенных концентраций изучаемых препаратов. Скорость роста колоний (в %) рассчитывали по формуле:

$$\frac{\text{Количество клеток/колонию (сред.значение) в опытных чашках} - 1}{\text{Количество клеток/колонию в контрольных чашках} - 1} \times 100\%$$

Для каждой «точки» в определенные дни были проведены подсчеты количества клеток по микроколониям. Для подтверждения отсутствия токсичности препаратов в выбранном диапазоне концентраций была оценена выживаемость клеток после воздействия, которую определяли по соотношению количества выросших колоний в «опытных» и контрольных чашках. Результаты экспериментов представлены в таблице 7.

Таблица 6. Влияние Дикарбамина и  $\alpha$ -интерферона на

пролиферативную активность клеток меланомы В-16 мышей и  
меланомы М-5 человека

Препара т	Концен- трация  ИН  МЕ/мл	Начальная скорость размножения клеток (% клеток/колонию по отношению к контролю) на срок после контакта с препаратами								
		48 часов			72 часа			96 часов		
		Без Д	Д, 0,01 мкМ	Д, 1,0 МкМ	Без Д	Д, 0,01 мкМ	Д, 1,0 мкМ	Без Д	Д, 0,01 мкМ	Д, 1,0 мкМ
Контроль М-5		100,0	84,2	69,0	100,0	73,6	50,0	100,0	70,2	49,1
ИН	7,0	111,3	79,1	54,7	94,8	49,1	36,9	73,0	46,9	33,3
	70,0	53,7	40,5	30,7	51,9	34,9	24,5	48,8	31,7	23,9
Контроль В-16		100,0	52,9	44,6	100,0	61,0	43,6	-	-	-
ИН	70,0	-	-	-	50,2	-	26,1	-	-	-
	700,0	38,0	24,9	21,5	29,8	22,0	16,0	-	-	-

Из таблицы видно, что в контроле с меланомой М-5 НСРК сохранялся на уровне 100% в течение 96 часов.

В образцах с клетками М-5 при добавлении  $\alpha$ -интерферона в концентрации 7,0 МЕ/мл через 48 часов НСРК увеличивался до 111,3% и замедлялся лишь через 72 и 96 часов до 94,8 и 73,0%, соответственно. При добавлении  $\alpha$ -интерферона в концентрации 70 МЕ/мл НСРК замедлялся через 48 часов до 53,7%, через 72 часа до 51,9%, а через 96 часов до 48,8%. Т.е. максимальный ингибирующий эффект  $\alpha$ -интерферона достигал 50% НСРК и был получен при использовании концентрации препарата 70 МЕ/мл.

При добавлении Дикарбамина в концентрации 0,01 мкМ НСРК замедлялся через 48 часов до 82,4%, через 72 часа до 73,6%, а через 96 часов до 70,2%, а при добавлении 1,0 мкМ НСРК замедлялся через 48 часов до 69,0%, через 72 часа до 50,0%.

Таким образом максимальный ингибирующий эффект Дикарбамина достигал также 50% НСРК и был получен при концентрации препарата 1,0 мкМ.

Опыты на В-16 при использовании  $\alpha$ -интерферона в концентрации 70,0 МЕ/мл НСРК замедлялся через 72 часа до 50,0% а при добавлении Дикарбамина в двух указанных концентрациях НСРК замедлялся через 48 часов до 52,9 и 44,6%, соответственно, а через 72 часа до 61,0 и 44,6%, соответственно. Существенное снижение показателя НСРК до 38,0 и 29,8% получено только при добавлении  $\alpha$ -интерферона в



концентрации 700 МЕ/мл.

Таким образом, проведенные эксперименты показали, что препараты  $\alpha$ -интерферон и Дикарбамин задерживают рост колоний клеток меланомы М-5 и меланомы В-16 на уровне 40,0-50,0%, что характерно для индукторов дифференцировки. Более выраженное ингибирование НСРК можно получить только в случае увеличения концентрации  $\alpha$ -интерферона в 100 раз.

Совместное добавление к клеткам М-5  $\alpha$ -интерферона в концентрации 70,0 МЕ/мл и Дикарбамина показало, что во всех случаях показатель НСРК снижался до 30,7-24,0-31,0% соответственно срокам регистрации. Наибольший эффект получен на меланоме В-16 при совместном применении  $\alpha$ -интерферона в концентрации 700 МЕ/мл и Дикарбамина в обеих концентрациях: НСРК снижался через 48 часов до 24,9 и 29,8%, а через 72 часа до 22,0 и 16,0%, соответственно.

Таким образом, Дикарбамин, аналогично  $\alpha$ -интерферону, замедляет пролиферацию клеток меланомы В-16 мышей и меланомы человека М-5 и не влияет на их выживаемость. Действие Дикарбамина, как показано в приведенных примерах, характерно для индукторов дифференцировки и в комбинации с известным индуктором дифференцировки  $\alpha$ -интерфероном на меланомных клетках носит аддитивный характер. Этот эффект приводит к усилению ингибирования роста опухоли и является показанием для повышения эффективности иммунотерапии

меланом.

Пример 6. Распределение опухолевых клеток по фазам клеточного цикла в разные сроки введения Дикарбамина.

Опыты ставили на перевиваемой меланоме В-16. Влияние препарата Дикарбамин на распределение опухолевых клеток было изучено по содержанию ДНК на разных сроках введения препарата.

С 6-го дня после перевивки опухоли мыши в течение 10 дней получали по 0,5 мг/кг Дикарбамина ежедневно в желудок. Забой животных с последующим изучением опухолевого материала осуществляли на 10, 12, 16 и 18 дни после перевивки, т.е., соответственно, на 5 и 7 дни введения Дикарбамина, а также через 2 и 4 дня после прекращения его 10-дневного введения.

Результаты эксперимента показали, что Дикарбамин вызывает существенное увеличение доли интерфазных опухолевых клеток ( $IIG^1$ ) (~25%). При этом при неизменной доле пролиферирующих клеток (~30%), отмечается увеличение доли  $IIG^2$ -клеток (12-14%). В соответствии с этим доля нормальных клеток стромы ( $IG^1$ ) в образцах компенсаторно снижается. Указанные изменения наиболее ярко выражены после 5-10 введений Дикарбамина.

Курсовое введение Дикарбамина вызывает перестройку кинетики популяции опухолевых клеток. Отмечается задержка клеток в синтетической (S-фазе) цикла с компенсаторным

уменьшением доли готовых к делению и делящихся клеток ( $G^2$  фаза). Одновременно происходит накопление опухолевых клеток в стационарной  $G^1$  фазе.

Дикарбамин, снижая уровень пролиферативной активности, способствует накоплению клеток в стационарной (непролиферирующей) фазе клеточного цикла. Он может замедлить рост опухоли и способствовать переходу клеток в более дифференцированное состояние.

Пример 7. Эффективность Дикарбамина в отношении гематологической токсичности циклофосфана, его комбинаций с цисплатином и карбоплатином.

Гематокорректирующее действие Дикарбамина изучали на мышках гибридах первого поколения  $F_1$  (CBA x  $C_{57}Bl$ ) самцах.

7.1 Для изучения влияния Дикарбамина на гематотоксическое действие циклофосфана (ЦФ) использовали 4 группы животных:

- 1 группа - Дикарбамин 500 мкг/кг ежедневно, начиная за 5 дней до ЦФ, и в течение 5 дней после введения ЦФ 200 мг/кг;
- 2 группа - ЦФ однократно 200 мг/кг;
- 3 группа - Интактный контроль;
- 4 группа - Дикарбамин 500 мкг/кг ежедневно в течение 10 дней.

Полученные данные представлены в Таблице 7.

Таблица 7. Общее количество лейкоцитов периферической крови

мышей под воздействием циклофосфана и циклофосфана в комбинации с Дикарбамином.

Группа	Общее количество лейкоцитов (тыс в мм <sup>3</sup> ) на сутки после введения циклофосфана						
	3	5	7	10	13	17	21
1	2,80±	7,96±	13,38±	11,88±	13,30±	12,40±	12,90±
	0,22	1,10	1,54	1,92	1,48	1,76	2,60
2	1,06±	4,38±	10,50±	6,44±	12,20±	12,20±	11,86±
	0,44	0,77	3,02	0,60	3,02	1,80	1,32
3	16,50±	16,10±	14,80±	15,80±	14,90±	16,90±	14,70±
	8,20	3,20	3,30	1,90	2,70	4,70	2,80
4	15,70±	15,30±	17,30±	15,70±	12,50±	17,80±	16,30±
	4,30	7,80	5,10	3,80	3,52	4,70	3,90

Полученные данные показывают, что применение Дикарбамина в комбинации с ЦФ позволяет снизить гематотоксическое действие последнего и ускорить восстановление показателей крови.

7.2. При изучении влияния Дикарбамина на гематотоксическое действие комбинаций ЦФ с производными платины, Дикарбамин вводили мышам в желудок в течении 20 дней ежедневно в разовой дозе 500 мкг/кг. Цитостатики

вводили внутривенно однократно на пятые сутки от начала курса введений Дикарбамина. Дозы цитостатиков указаны в Таблицах 8 и 9.

Результаты исследований влияния Дикарбамина на динамику лейкоцитов в периферической крови мышей, получавших комбинированное введение ЦФ с цисплатином или карбоплатином представлены в Таблицах 8 и 9, соответственно.

Таблица 8. Влияние Дикарбамина на гематотоксичность циклофосфана в комбинации с цисплатином

Цитостатик	Доза (мг/кг)	Общее количество лейкоцитов в периферической крови (тыс в мм <sup>3</sup> ) на сутки после введения цитостатиков					Сроки гибели (сутки)
		0	3	5	7	21	
Дикарбамин	200	11,30±	2,32±	6,60±	10,40±	12,30±	8; 16
ЦФ	8	2,30	0,49	0,90	1,54	1,56	
Цисплатин	8	2,30	0,33	0,77	1,15	1,02	3; 4; 7
Дикарбамин	100	11,30±	4,14±	11,40±	14,90±	11,80±	нет
ЦФ	4	2,30	0,60	1,10	1,32	1,32	
Цисплатин	4	2,3	0,66	0,66	0,88	1,4	нет



Дикарбамин							
ЦФ	200	11,50±	3,10±	12,80±	15,30±	12,30±	10
Карбоплатин	30	2,80	0,70	1,37	1,26	0,89	
ЦФ	200	11,30±	1,18±	4,60±	7,54±	12,60±	3
Карбоплатин	30	2,30	0,49	0,60	0,77	1,28	
Дикарбамин							нет
ЦФ	100	11,50±	4,04±	10,40±	14,80±	11,80±	
Карбоплатин	15	2,80	0,44	1,59	1,76	1,34	нет
ЦФ	100	11,30±	2,74±	6,48±	10,50±	13,20±	
Карбоплатин	15	2,30	0,49	0,60	1,38	1,50	нет
Дикарбамин							
ЦФ	50	11,30±	6,60±	10,90±	11,20±	10,90±	нет
Карбоплатин	7,5	2,30	0,77	1,21	1,20	1,28	
ЦФ	50	11,50±	3,94±	8,72±	10,80±	11,20±	нет
Карбоплатин	7,5	2,80	1,04	1,98	2,40	0,99	

Представленные данные показывают, что при применении Дикарбамина с карбоплатином и циклофосфаном (Таблица 10) динамика лейкоцитов в периферической крови и сроки гибели животных при применении летальных доз цитостатиков были практически аналогичными.

Таким образом, Дикарбамин тормозит развитие лейкоцитопении во всех исследованных режимах, ускоряет восстановление общего количества лейкоцитов и отодвигает

срок гибели мышей при применении цитостатиков в летальных дозах.

Пример 8. Эффективность Дикарбамина в отношении снижения гематологической токсичности химиотерапии при раке яичников.

Действие Дикарбамина изучали у 13 больных раком яичников III-IV ст., которым были проведены 77 курсов химиотерапии по схеме Карбоплатин  $400 \text{ мг/м}^2$  в/в капельно однократно + Циклофосфан  $600 \text{ мг/м}^2$  в/в капельно однократно, курсы повторяли через 28 дней. Дикарбамин назначали в дозе 100 мг внутрь после еды ежедневно, начиная за 5 дней до первого курса и дальше в течение 3-х недель. Длительность введения 26 дней, курсовая доза 2600 мг. За 5 дней до второго курса химиотерапии снова начинали давать Дикарбамин и продолжали в течение 21 дня. Общая длительность приема Дикарбамина в течение 2-х курсов химиотерапии составила 52 дня.

Гематологическая токсичность (лейкоцитопения, нейтропения и тромбоцитопения) оценена у 13 больных, получивших 77 курсов химиотерапии с Дикарбамином в сравнении с группой из 7 больных, получивших 25-27 курсов химиотерапии без Дикарбамина (контроль). Показатели кроветворения оценивали в динамике многократно до и после проведения химиотерапии (контроль) и также в динамике до и после приема



Дикарбамина в испытуемой группе. Ниже представлены показатели кроветворения у отдельных больных, получавших химиотерапию по указанной схеме вместе с Дикарбамином, или без него.

#### 8.1 Больные, получавшие химиотерапию без Дикарбамина

Женщина, 51 год, диагноз: рак яичников, III стадия, асцит, получила 1-й курс химиотерапии по схеме лечения: циклофосфан 600 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин 400 мг/м<sup>2</sup> однократно (табл.10) Анализ крови клинический, 1 курс химиотерапии.

Таблица 10

Показатель, единицы измерения	До начала 1 курса ХТ	Через 5 дней после 1 курса ХТ	Через 2 недели после 1 курса ХТ	Через 3 недели после 1 курса ХТ
Лейкоциты 10 <sup>9</sup> /л	4,5	3,8	2,2	2,0
Нейтрофилы 10 <sup>9</sup> /л	2,9	2,4	0,9	0,8
Тромбоциты	168	160	154	150

Второй курс лечения отсрочен на 7 дней в связи с нейтропенией.

2-й курс химиотерапии проведен по схеме лечения: циклофосфан 600 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин 400 мг/м<sup>2</sup> однократно без Дикарбамина (табл.11).

Анализ крови клинический, 2 курс химиотерапии.

Таблица 11

Показатель, единицы измерения	До начала 2 курса ХТ	Через 5 дней после 2 курса ХТ	Через 2 недели после 2 курса ХТ	Через 3 недели после 2 курса ХТ
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	3,5	3,3	2,0	2,1
Нейтрофилы $10^9/\text{л}$	2,2	2,0	0,8	0,9
Тромбоциты	178	170	154	150

Третий курс отсрочен в связи с нейтропенией.

Женщина, 63 года, диагноз: рак яичников, IV стадия, метастатическое поражение правого пахового лимфоузла, асцит получила 1-й курс химиотерапии по схеме лечения: циклофосфан  $600 \text{ мг}/\text{м}^2$  и карбоплатин  $400 \text{ мг}/\text{м}^2$  однократно без Дикарбамина (табл.12).

Анализ крови клинический, 1 курс химиотерапии.

Таблица 12

Показатель, единицы измерения	До начала 1 курса ХТ	Через 5 дней после 1 курса ХТ	Через 2 недели после 1 курса ХТ	Через 3 недели после 1 курса ХТ
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	5,0	3,9	2,1	2,0
Нейтрофилы	3,2	1,7	0,9	1,0

10 <sup>9</sup> /л				
Тромбоциты	160	150	151	152

Второй курс отсрочен на 4 дня в связи с лейко- и нейтропенией.

2-й курс химиотерапии проведен по схеме лечения: циклофосфан 600 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин 400 мг/м<sup>2</sup> однократно без Дикарбамина (табл.13).

Анализ крови клинический, 2 курс химиотерапии.

Таблица 13

Показатель, единицы измерения	До начала 2 курса ХТ	Через 5 дней после 2 курса ХТ	Через 2 недели после 2 курса ХТ	Через 3 недели после 2 курса ХТ
Лейкоциты 10 <sup>9</sup> /л	3,7	2,9	2,0	2,2
Нейтрофилы 10 <sup>9</sup> /л	2,2	1,8	0,9	0,9
Тромбоциты	166	160	140	155

Третий курс отсрочен в связи с нейтропенией.

## 8.2 Больные, получавшие химиотерапию вместе с Дикарбамином

Женщина, 51 год, диагноз: рак яичников, III стадия, получила 1 курс химиотерапии по схеме лечения: циклофосфан 600 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин 400 мг/м<sup>2</sup> в первый день лечения.

Дикарбамин назначали в дозе 100 мг ежедневно, начиная за 5 дней до 1 курса ХТ и затем в течение 21 дня. Период лечения Дикарбамином - 26 дней до 2 курса (табл. 14).

Анализ крови клинический, 1 курс химиотерапии с Дикарбамином.

Таблица 14

Показатель, единицы измерения	До начала введения Дикарбамина	До начала 1 курса ХТ	После окончания приема Дикарбамина	Перед 2 курсом ХТ
	«0»сутки	5 суток	21 сутки	33 сутки
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	5,9	5,5	4,7	4,0
Нейтрофилы $10^9/\text{л}$	4,2	4,0	3,3	2,9
Тромбоциты	170	164	160	158

2-й курс химиотерапии проведен в срок по схеме лечения: циклофосфан  $600 \text{ мг}/\text{м}^2$  и карбоплатин  $400 \text{ мг}/\text{м}^2$  однократно на 28 день после проведения первого курса химиотерапии+Дикарбамин. Дикарбамин назначали в дозе 100 мг за 5 дней до 2 курса и затем ежедневно в течение 21 дня. Общая длительность приема Дикарбамина (2 курса химиотерапии) 52 дня (табл. 15).

Анализ крови клинический, 2 курс химиотерапии.

Таблица 15

Показатель, единицы измерения	До начала введения Дикарбамина	До начала 2 курса ХТ	После окончания приема Дикарбамина	Перед 3 курсом ХТ
	28 сутки после 1 курса ХТ	33 сутки	54 сутки	61 сутки
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	4,9	5,0	4,2	4,2
Нейтрофилы $10^9/\text{л}$	3,2	3,3	3,1	3,0
Тромбоциты	180	170	160	160

Третий курс ХТ получен в срок.

Женщина, 75 лет, диагноз: рак яичников, III стадия, асцит, получила химиотерапию с Дикарбамином по схеме лечения: циклофосфан  $600 \text{ мг/м}^2$  и карбоплатин  $400 \text{ мг/м}^2$  в первый день лечения. Дикарбамин назначали в дозе 100 мг ежедневно, начиная за 5 дней до 1 курса ХТ и затем 21 день. Период лечения Дикарбамином - 26 дней до 2 курса (табл. 16). Анализ крови клинический, 1 курс химиотерапии с Дикарбамином.

Таблица 16

Показатель, единицы измерения	До начала введения Дикарбамина	До начала 1 курса ХТ	После окончания приема Дикарбамина	Перед 2 курсом ХТ
	«0»сутки	5 суток	21 сутки	33 сутки
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	7,4	7,2	6,6	5,2
Нейтрофилы $10^9/\text{л}$	5,7	5,0	5,2	3,8
Тромбоциты	174	165	162	167

2-й курс химиотерапии проводят в срок по схеме лечения: циклофосфан  $600 \text{ мг/м}^2$  и карбоплатин  $400 \text{ мг/м}^2$  однократно на 28 день после проведения первого курса химиотерапии+Дикарбамин. Дикарбамин назначают в дозе 100 мг за 5 дней до 2 курса и затем ежедневно в течение 21 дня. Общая длительность приема Дикарбамина (2 курса химиотерапии) 52 дня (табл. 17).

Анализ крови клинический, 2 курс химиотерапии.

Таблица 17

Показатель, единицы измерения	До начала введения Дикарбамина	До начала 2 курса ХТ	После окончания приема Дикарбамина	Перед 3 курсом ХТ
-------------------------------------	--------------------------------------	----------------------------	---	----------------------

	28 сутки после 1 курса ХТ	33 сутки	54 сутки	61 сутки
Лейкоциты $10^9/\text{л}$	7,8	8,2	7,6	7,2
Нейтрофилы $10^9/\text{л}$	5,2	6,0	6,2	5,8
Тромбоциты	165	160	162	157

Третий курс получен в срок.

Женщина, 65 лет, диагноз: рак яичников, IV стадия, асцит, метастатическое поражение пупочной области, получила химиотерапию с Дикарбамином по схеме лечения: циклофосфан  $600 \text{ мг}/\text{м}^2$  и карбоплатин  $400 \text{ мг}/\text{м}^2$  в первый день лечения. Дикарбамин назначают в дозе 100 мг ежедневно, начиная за 5 дней до 1 курса ХТ и затем 21 день. Период лечения Дикарбамином - 26 дней до 2 курса (табл. 18)

Анализ крови клинический, 1 курс химиотерапии с Дикарбамином

Таблица 18..

Показатель, единицы измерения	До начала введения Дикарбамина	До начала 1 курса ХТ	После окончания приема Дикарбамина	Перед 2 курсом ХТ
	«0» сутки	5 сутки	21 сутки	33 сутки
Лейкоциты	6,6	5,9	5,5	5,0

10 <sup>9</sup> /л				
Нейтрофилы	5,0	4,2	4,4	3,4
10 <sup>9</sup> /л				
Тромбоциты	170	172	166	164

2-й курс химиотерапии с Дикарбамином проводят в срок по схеме лечения: циклофосфан 600 мг/м<sup>2</sup> и карбоплатин 400 мг/м<sup>2</sup> однократно на 28 день после проведения первого курса химиотерапии+Дикарбамина. Дикарбамина назначают в дозе 100 мг за 5 дней до 2 курса и затем ежедневно в течение 21 дня. Общая длительность приема Дикарбамина (2 курса химиотерапии) 52 дня (табл. 19).

Анализ крови клинический, 2 курс химиотерапии с Дикарбамином  
Таблица 19

Показатель, единицы измерения	До начала введения Дикарбамина	До начала 2 курса ХТ	После окончания приема Дикарбамина	Перед 3 курсом ХТ
	28 сутки после 1 курса ХТ	33 сутки	54 сутки	61 сутки
Лейкоциты 10 <sup>9</sup> /л	5,6	5,8	5,7	5,5
Нейтрофилы 10 <sup>9</sup> /л	3,0	3,2	3,4	3,2



Тромбоциты	170	170	176	165
------------	-----	-----	-----	-----

Третий курс получен в срок.

8.3 Сравнительные данные по гематологической токсичности у пациентов, получавших химиотерапию и получавших или не получавших Дикарбамин, представлены в Таблицах 20 и 21.

Таблица 20. Число (%) больных с гематологической токсичностью, получавших химиотерапию без Дикарбамина

Вид токсичности	Число курсов ХТ	Степень гематологической токсичности по ВОЗ					
		0	I	II	III	IV	III+IV
Лейкопения	26	3 11,5%	5 19,2%	12 46,1%	5 19,2%	1 3,8%	6 23,07%
Нейтропения	26	7 26,9%	0	8 30,7%	6 23,07%	5 19,2%	11 42,3%
Тромбоцитопения	25	10 40,0%	3 12,0%	7 28,0%	4 16,0%	1 4,0%	5 20,0%

Таблица 21. Число (%) больных с гематологической токсичностью, получавших химиотерапию с Дикарбамином

		Степень гематологической токсичности по ВОЗ
--	--	---

Вид токсич- ности	Число курсов ХТ	Степень гематологической токсичности по ВОЗ					
		6	18	43	10	0 IV	10
Лейко- пения	77 100%	7,0%	23,3%	55,8%	12,9%		12,9%
Нейтро- пения	67 100%	21 31,3%	12 17,9%	23 34,3%	5 7,4%	6 8,9%	11 16,4%
Тромбо- цито- пения	76 100%	27 35,5%	32 42,1%	10 13,1%	6 7,8%	1 1,3%	7 9,1%

Полученные данные показывают, что лимитирующая гематологическая токсичность III-IV ст. без применения Дикарбамина (таблица 7) достигает по лейкопении более 23,0%, нейтропении - 42,6% и тромбоцитопении - 20,0%.

В группе больных, получающих Дикарбамин, частота возникновения лейко-, нейтро- и тромбоцитопении была значительно меньше (таблица 8). Гематологическая токсичность уменьшалась до 12,9%, т.е. в 1,8 раза, нейтропения - в 2,6 раза, тромбоцитопения - в 2,2 раза. Таким образом, применение Дикарбамина приводило к снижению всех перечисленных видов гематологической токсичности.

Ниже представлены данные, подтверждающие, что введение Дикарбамина не только не снижает эффективность лечения

цитостатическими агентами, а напротив, несколько усиливает достигаемый эффект.

Эффективность лечения оценивали в группах пациентов после 2-х курсов химиотерапии, которые не получали или получали Дикарбамин по описанной выше схеме. Оценку эффективности проводили по общепринятым параметрам: ПР - полная ремиссия, ЧР - частичная ремиссия, СБ - стабилизация, Прогр. - прогрессирование.

Полученные данные представлены в Таблице 22.

Таблица 22. Эффективность лечения больных по схеме Циклофосфан + карбоплатин с Дикарбамином

Группы больных	Число больных	ПР	ЧР	СБ	Прогр.
Химиотерапия	6 100,0%	2 33,3%	1 16,6%	2 33,3%	1 16,6%
Химиотерапия+ Дикарбамин	15 100,0%	4 26,6%	7 46,6%	2 13,3%	2 13,3%

Представленные данные показывают, что в группе больных, получавших химиотерапию без Дикарбамина, общая эффективность лечения составила 83,3%. В группе больных, получавших химиотерапию с введением Дикарбамина, эффективность лечения составила 86,6%.

Таким образом, применение Дикарбамина при лечении больных, получающих химиотерапию приводит к снижению основных

видов гематологической токсичности без уменьшения эффективности лечения.

Представленные выше экспериментальные и клинические данные с очевидностью доказывают эффективность Дикарбамина как индуктора дифференцировки, которая проявляется в стабилизации роста дифференцирующейся меланомы мышей и человека, в том числе и в случае отсутствия эффективности химиотерапии.

Также было показано, что влияние дикарбамина на рост опухоли связано с задержкой пролиферативной активности опухолевых клеток и повышением степени дифференцировки, в частности, меланинсинтезирующей способности.

В клинических исследованиях выявлены свойства Дикарбамина значительно уменьшать гематологическую токсичность при лечении онкологических больных при различных схемах комбинированной химиотерапии. Так, при лечении больных раком яичников препаратами платины, циклофосфаном на фоне применения дикарбамина, степень лимитирующей нейтропении и тромбоцитопении снижалась в 2-3 раза. Эффективность лечения при этом не снижалась.